

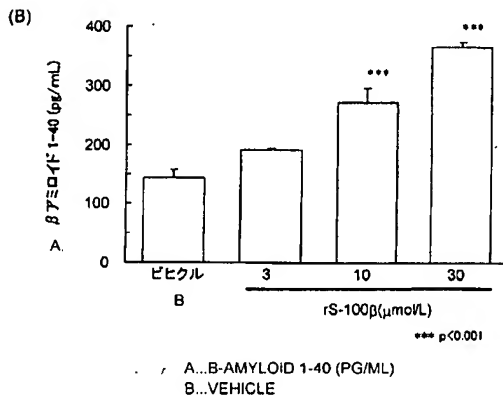
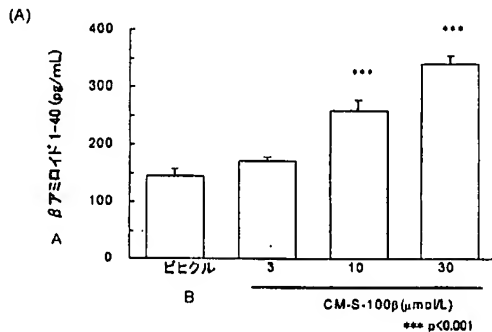
(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003年3月27日 (27.03.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/024485 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 45/00, 31/7072, 31/336, 31/35, 31/661, 31/215, A61P 25/28, 25/16, 25/06, 25/08, 25/18, 25/20, 25/24, 35/00, 9/10, 3/00
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 小野薬品工業株式会社 (ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒541-8526 大阪府 大阪市 中央区道修町 2 丁目 1 番 5 号 Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/09440
- (22) 国際出願日: 2002年9月13日 (13.09.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2001-279901 2001年9月14日 (14.09.2001) JP
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 下田 泰治 (SHIMODA, Taiji) [JP/JP]; 〒618-8585 大阪府 三島郡 島本町 桜井 3 丁目 1 番 1 号 小野薬品工業株式会社 水無瀬総合研究所内 Osaka (JP). 矢田 宣道 (YADA, Nobumichi) [JP/JP]; 〒618-8585 大阪府 三島郡 島本町 桜井 3 丁目 1 番 1 号 小野薬品工業株式会社 水無瀬総合研究所内 Osaka (JP). 立石 成人 (TATEISHI, Narito) [JP/JP]; 〒618-8585 大阪府 三島郡 島本町 桜井 3 丁目 1 番 1 号 小野薬品工業株式会社 水無瀬総合研究所内 Osaka

[続葉有]

(54) Title: REMEDIES FOR DISEASES CAUSED BY β -AMYLOIDS CONTAINING 2-100 β INHIBITOR AS THE ACTIVE INGREDIENT(54) 発明の名称: S-100 β 阻害剤を有効成分とする β アミロイド起因疾患治療剤

(57) Abstract: Remedies and/or preventives for diseases caused by β -amyloids which contain, as the active ingredient, an S-100 β inhibitor. Because of having an effect of inhibiting the production of β -amyloids, the S-100 β inhibitor is useful in remedies and/or preventives caused by β -amyloids, for example, neurodegenerative diseases, Down's disease, boxer's disease, progressive supranuclear palsy, astrocytoma, nerve function disorders following brain attack or brain trauma, multiple sclerosis, dementia, schizophrenia, epilepsy, anxiety, vomit, migraine, nerve cell death, depression, sleeping disorders, eating disorders such as inappetence, urinary incontinence, hypoxemia, cerebral infarction, brain tumor, hyperoxia-induced convulsion and hyperoxia-induced toxemia, inflammatory or neuropathic pain and meningitis.

[続葉有]

WO 03/024485 A1



(JP) 勝部 伸夫 (KATSUBE, Nobuo) [JP/JP]; 〒618-8585
大阪府 三島郡 島本町桜井 3 丁目 1 番 1 号 小野薬品
工業株式会社 水無瀬総合研究所内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 大家 邦久 (OHIE, Kunihiisa); 〒103-0013 東京
都 中央区 日本橋人形町 2 丁目 2 番 6 号 堀口第 2 ビ
ル 7 階 大家特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,
OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ
特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特
許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, MI, MR,
NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

S-100β 阻害剤を有効成分とする β アミロイド起因疾患の治療および
／または予防剤。

S-100β 阻害剤は β アミロイド産生を抑制する作用を有するため、β
アミロイドを起因物質とする疾患、すなわち神経変性疾患、ダウン症、ボク
サー症、進行性核上麻痺、星状膠細胞腫、脳卒中や脳外傷後の神経機能障害、
多発性硬化症、痴呆、精神分裂症、てんかん、不安、嘔吐、偏頭痛、神経細
胞死、うつ病、睡眠障害、食欲不振などの摂食障害、尿失禁、低酸素症、脳
梗塞、脳腫瘍、高酸素痙攣および高酸素毒症、炎症性もしくは神経障害性疼
痛、髄膜炎等の治療および／または予防剤として有用である。

明 細 書

S-100 β 阻害剤を有効成分とする β アミロイド起因疾患治療剤

5 技術分野

本発明は、S-100 β 阻害剤を有効成分とする β アミロイド起因疾患の治療剤に関する。

背景技術

- 10 中枢神経系の実質を構成する細胞には神経細胞とグリア細胞があり、細胞数はグリア細胞が神経細胞よりはるかに多い。グリア細胞は神経細胞の働きを支持する役割を担っている。グリア細胞の一種であるアストロサイトは、神経細胞の支持細胞として細胞外のイオンおよび神経伝達物質の恒常性維持 (Pharmacology and function, pp. 193-228, Academic Press, Inc., (1993)) や神経栄
- 15 養因子の供給 (Pharmacology and function, pp. 267-308, Academic Press, Inc., (1993)) などの機能を有していることから、脳機能を制御する重要な役割を演じていると考えられる。

- 従来、神経変性疾患（アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症など）の成因は主に神経細胞の異常にあると考えられてきた。しかし、近年神経細胞を
- 20 取り囲むグリア細胞、特にアストロサイトの機能的異常にあるとの考えが有力になってきた。

- β アミロイドは神経変性疾患の一つであるアルツハイマー病の病理学的特徴の一つである老人斑の主構成物である。 β アミロイドは正常人の脳内にも存在するが速やかに分解されるものと考えられている。このタンパクはアミ
- 25 ロイド前駆体タンパク質の代謝過程において β セクレターゼおよび γ セクレターゼにより副次的に生成される。アミロイド前駆体タンパク質は通常 α セ

クレターゼによって分解されるが、この場合 β アミロイドは産生されないことが知られている。 β アミロイドには β アミロイド1-40と β アミロイド1-42 (43) の二つのアイソフォームが存在するが、転写レベルではなく β セクレターゼおよび γ セクレターゼによってアミロイド前駆体タンパク質代謝段階で生成され则认为られている。脳で産生される β アミロイドのほとんどは β アミロイド1-40だが、難溶性の β アミロイド1-42 (43) の方が凝集・沈着しやすく、現在のところどちらが病態に深く関与するのかは解明されていない。また産生された β アミロイドは中性エンドペプチダーゼによって分解されることが知られている。

- 10 アルツハイマー病において、 β アミロイドが凝集して不溶性の繊維形成がなされて脳に沈着し老人斑を形成する。現在、アルツハイマー病の根治的治療法としてアミロイド前駆体タンパク質および β アミロイドの代謝系を制御し β アミロイド産生を抑制する方法が注目されている。

- 神経細胞傷害時、活性化したアストロサイトにおいてアミロイド前駆体タンパク質発現が増大していることが知られている (Neuron, 3, 275-285, (1989))。また β アミロイドは神経毒性を示すことから、アミロイド前駆体タンパク質の異常代謝による β アミロイドの過剰産生、蓄積がアルツハイマー病の発症および進展に関与していると考えられる (Science, 245, 417-420, (1989))。さらに、 β アミロイドの神経毒性においてN-メチル-D-アスパラギン酸受容体と一酸化窒素合成酵素を介した活性酸素産生亢進の関与が報告されている (J. Neurochem., 76(4), 1050-1056, (2001))。したがって、 β アミロイドが活性酸素起因疾患に関与している可能性が考えられる。

- S-100 β はアストロサイト特異的タンパク質であり、カルシウム結合部位を有し細胞内カルシウム濃度の調節、種々の細胞骨格蛋白と結合し細胞の形態変化や神経伝達物質の遊離等に関与している (TIBS, 13, 437-443, (1988))。S-100 β はアストロサイトの活性化により産生され細胞外に放

出される。放出された S-100 β は、神経細胞に対し栄養因子的な作用および傷害因子的な作用 (Progress in Neurobiology, 46, 71-82, (1995)) を示し、またアストロサイトに対しては増殖促進作用や誘導型一酸化窒素合成酵素の発現作用を有することが報告されている (J. Biological Chemistry, 271, 2543-2547, (1996))。

また、S-100 β は脳傷害時、活性化されたアストロサイトにおいて過剰発現することが知られている。アルツハイマー患者の脳内で S-100 β 量が増加しており (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 7611-7615, (1989))、その増加量はアルツハイマー患者の脳における老人斑密度と相関があることが報告されている (J. Neurosci. Res., 39, 398-404, (1994))。さらにアルツハイマー患者の脳における老人斑近傍には S-100 β の過剰発現を伴った活性化したアストロサイトが存在し、その発現強度は神経の異常突起伸展との間に相関が見られることが報告されている (J. Neuropathol. Exp. Neurol., 55, 273-279, (1996))。その他にも、脳卒中 (Stroke, 30, 1190-1195, (1999))、頭部外傷 (Neurosurgery, 45, 477-483, (1999))、多発性硬化症 (Acta Neurol Scand, 96, 142-144, (1997))、ダウン症 (J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 116, 281-285, (1998)) などの患者の血清中もしくは脳髄液中で S-100 β 量の増加がみられる。

これまでに、S-100 β 、 β アミロイドおよびアミロイド前駆体タンパク質の関係については以下のことが報告されている。

1) ラット神経細胞において、S-100 β はアミロイド前駆体タンパク質とそれをコードする mRNA 量を増加させた (J. Neurochem., 71(4), 1421-1428, (1998))。

2) トランスジェニックマウス (アミロイド前駆体タンパク質が過剰発現した家族性アルツハイマー病マウス) において、 β アミロイド斑が出現する前に S-100 β が過剰発現した (J. Neurochem., 74(1), 295-301, (2000))。

3) ラット神経細胞において、 β アミロイドは S-100 β の遺伝子発現を

増加させた (Mol. Brain Res., 34(1), 118-126, (1995))。

アルツハイマー病などの神経変性疾患において、 β アミロイドおよびS-100 β の過剰発現が確認されている。しかしながら、これらのタンパク質の相互関係には諸説がありいまだ明らかになっていない。

5

発明の開示

アルツハイマーをはじめとする神経変性疾患の治療における最終目標は、脳内病理過程の進行を遮断し、発症および進行を完全に抑制することにある。しかし、現在使用されている治療薬はコリンエステラーゼ阻害剤などの対症療法薬である。また現在臨床応用検討中の抗炎症薬や女性ホルモンなども内在する病変悪化を修正する根治治療ではない。したがって、神経変性疾患の原因を解明し、根治治療薬を提供することが急務である。

本発明者らは、神経変性疾患におけるS-100 β の発現と β アミロイドの生成との関係について種々検討を行った結果、S-100 β が β アミロイド産生量を増加させることを明らかにし、本発明を完成した。

すなわち、本発明は下記の β アミロイド起因疾患の治療および/または予防剤、被験化合物の β アミロイド産生抑制作用を測定することによる化合物のスクリーニング方法、およびその方法により得られる化合物を提供する。

1. S-100 β 阻害剤を有効成分とする β アミロイド起因疾患の治療および/または予防剤。

2. S-100 β 阻害剤が以下の(1)～(6)の少なくともひとつから選択される機構に作用して β アミロイド産生を抑制することを特徴とする前項

1記載の β アミロイド起因疾患治療および/または予防剤：

- (1) β セクレターゼおよび γ セクレターゼによる β アミロイド産生、
- (2) α セクレターゼによるアミロイド前駆体タンパク質の代謝、
- (3) 中性エンドペプチダーゼによる β アミロイドの代謝、

- (4) S-100 β の細胞内への取り込み機構、
 - (5) 糖付加、
 - (6) タンパク質成熟化。
3. β アミロイドに起因する疾患が、神経変性疾患、ダウン症、ボクサー症、
- 5 進行性核上麻痺、星状膠細胞腫、脳の神経機能障害、多発性硬化症、痴呆、精神分裂症、てんかん、不安、嘔吐、偏頭痛、神経細胞死、うつ病、睡眠障害、摂食障害、尿失禁、低酸素症、脳梗塞、脳腫瘍、高酸素痙攣および高酸素毒症、炎症性もしくは神経障害性疼痛、髄膜炎である前項1に記載の β アミロイド起因疾患治療および／または予防剤。
- 10 4. ヒト由来グリア細胞に(1) S-100 β を添加し β アミロイド産生を亢進させた条件下において、被験化合物を添加して、細胞から放出された β アミロイドを検出するか、または(2) 被験化合物を添加し、S-100 β を添加して、細胞から放出された β アミロイドを検出することによって、被験化合物の β アミロイド産生抑制作用を決定することを特徴とする β アミロ
- 15 イド産生抑制作用を有する化合物のスクリーニング方法。
5. β アミロイド産生抑制作用が以下の作用から選択される前項4記載のスクリーニング方法；
- (1) β セクレターゼまたは γ セクレターゼ阻害作用、
 - (2) α セクレターゼ活性化作用、
 - 20 (3) 中性エンドペプチダーゼ活性化作用、
 - (4) S-100 β 取り込み阻害作用、
 - (5) 糖付加阻害作用、
 - (6) タンパク質成熟化阻害作用。
6. 前項4記載のスクリーニング方法によって得られた化合物。
- 25 7. 前項6記載の化合物を有効成分とする前項1記載の β アミロイド起因疾患の治療および／または予防剤。

以下、本発明を詳細に説明する。

従来技術によれば、ラット神経細胞においてはS-100 β はアミロイド前駆体タンパク質とそれをコードするmRNA量を増加させることが報告されている。しかし、本発明者らの実験によってヒト由来グリア細胞においては、意外にもS-100 β はアミロイド前駆体タンパク質をコードするmRNA量を変化させず、S-100 β はアミロイド前駆体タンパク質量には影響を与えないことが確認された。すなわち、アミロイド前駆体タンパク質量は変化せず β アミロイド量のみが増加していることから、アミロイド前駆体タンパク質が代謝され β アミロイドを産生する過程もしくは β アミロイドが代謝される過程でS-100 β が作用することが新たに示唆された。

アミロイド前駆体タンパク質代謝過程においては、 α 、 β および γ セクレターゼの関与が知られており、 β アミロイドは β および γ セクレターゼの作用により産生され、 α セクレターゼで代謝された場合産生されないことが知られている。したがって、S-100 β は(1) β および γ セクレターゼを活性化もしくは(2) α セクレターゼを抑制していると考えられる。また産生された β アミロイドは中性エンドペプチダーゼで代謝されることが報告されていることから、S-100 β が(3) 中性エンドペプチダーゼを阻害していることも考えられる。さらに、アミロイド前駆体タンパク質の糖付加や成熟化を抑制すると、 β アミロイド産生が抑制されることが知られている。したがって、S-100 β が(4) 糖付加またはタンパク質成熟化を促進している可能性も考えられる。アルツハイマーをはじめとする神経変性疾患の根治的治療において、アミロイド前駆体タンパク質および β アミロイド代謝過程を制御し β アミロイド産生を抑制することが注目されてきた。しかしながら、S-100 β がアミロイド前駆体タンパク質および β アミロイド代謝過程に作用する事実は今回本発明者らが実験により初めて確認したことであり、神経変性疾患の根治治療薬を開発するうえで有用な事実である。

βアミロイドは、先に述べたように神経変性疾患等に関与している。今回、S-100βが（１）βおよびγセクレターゼ活性化、（２）αセクレターゼ抑制、（３）中性エンドペプチダーゼ阻害、（４）糖付加促進、（５）タンパク質成熟化促進の中から選ばれる少なくともひとつの作用によってβアミロイドの発現を促進することが本発明者らによって明らかにされた。したがって、S-100βを阻害することによりβアミロイドの過剰発現が関与していると考えられる疾患、特に神経細胞の欠落を特徴とする神経変性疾患等の治療に用いることができると考えられる。

すなわち、S-100β阻害剤はβアミロイドに起因する疾患の治療に用いることができると考えられる。βアミロイドに起因する疾患とはβアミロイドが増加することによって起こる疾患であり、具体的にはアルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患（アルツハイマー病、クロイツフェルトヤコブ病、パーキンソン病、ハンチントン病、オリブ橋小脳萎縮症、筋萎縮性側索硬化症等）、ダウン症、ボクサー症、進行性核上麻痺、星状膠細胞腫、脳卒中や脳外傷後の神経機能障害、多発性硬化症、痴呆、精神分裂症、てんかん、不安、嘔吐、偏頭痛、神経細胞死、うつ病、睡眠障害、食欲不振などの摂食障害、尿失禁、低酸素症、脳梗塞、脳腫瘍、高酸素痙攣および高酸素毒症、炎症性もしくは神経障害性疼痛、髄膜炎などが考えられる。

また、本発明にはS-100βで処置したヒト由来細胞を用いてβアミロイドを検出することを特徴とするβアミロイド起因疾患治療剤のスクリーニング方法も含まれる。

現在までに知られている一般的なβアミロイド抑制作用測定方法は、サイトカイン、ケモカインおよびC-キナーゼ等によってβアミロイド産生を亢進させる方法であるが、今回S-100βとβアミロイドの関係が明らかとなったことにより本発明のβアミロイド起因疾患治療剤のスクリーニングが可能となった。

より具体的には、ヒト由来グリア細胞にS-100 β を添加し、 β アミロイド産生を亢進させ、被験化合物を添加して、一定時間後細胞培養上清中の β アミロイド量を測定することにより、 β アミロイドの産生を抑制することのできる化合物を選択することができる。

- 5 ラットにはアミロイド前駆体タンパク質代謝酵素であるセクレターゼがほとんど存在しないことから β アミロイドの検出が不可能である。このような動物種によるタンパク質発現の差を考慮すると、本発明のスクリーニング方法では、ヒト由来細胞を用いることが好ましい。またスクリーニングのための細胞は、ヒト由来のグリア細胞であれば何でもよい。具体的には、ヒトグ
- 10 リオブラストーマ、アストロサイトーマ由来細胞株であるU-373MG、ヒトグリオブラストーマ由来細胞株のT98G、A-172、ヒトアストロサイトーマ由来細胞株のCCF-STTG1等があるが、種々検討した結果、ヒトグリオブラストーマ、アストロサイトーマ由来細胞株であるU-373MG細胞が好ましい。
- 15 被験化合物は、S-100 β 添加直前、直後または同時に加えてもよく、場合に応じて化合物の添加タイミングを変更してもよい。
- β アミロイド検出方法は、 β アミロイドを検出することができればどのような方法を用いてもよいが、例えば酵素免疫測定法、放射免疫測定、ウェスタンブロット等が挙げられる。
- 20 さらに本発明には前記のスクリーニング方法によって得られる化合物が含まれる。本スクリーニング系により β アミロイド産生を抑制する化合物、具体的には β および γ セクレターゼを抑制する化合物、 α セクレターゼを活性化する化合物、中性エンドペプチダーゼを活性化する化合物、糖付加を阻害する化合物、またはタンパク質成熟化を阻害する化合物などが選定できる。
- 25 またアストロサイトの活性化によって産生され細胞外に放出されたS-100 β は、アストロサイトの特定部位によって再取り込みされアストロサイト

自身に作用する。したがって本スクリーニング系ではS-100 β の取り込みを抑制する化合物をインビトロの系で簡便に選定することができる。これまでに、S-100 β がアストロサイトに作用することを阻害する化合物は報告されておらず、本発明によって初めて β アミロイド産生を抑制する化合物として認識されるものである。

図面の簡単な説明

図1 (A) はU-373MG細胞におけるCM-S-100 β の β アミロイド1-40産生促進作用を示し、(B) はU-373MG細胞におけるr S-100 β の β アミロイド1-40産生促進作用を示す。

図2 (A) はU-373MG細胞におけるCM-S-100 β の β アミロイド1-42産生促進作用を示し、(B) はU-373MG細胞におけるr S-100 β の β アミロイド1-42産生促進作用を示す。

図3 (1) ~ (4) は、各々CM-S-100 β による、 β アクチン（陰性対照）発現量変化、APP770発現量変化、APP751発現量変化、およびAPP695発現量変化を示し、(5) ~ (8) は、各々r S-100 β による、 β アクチン（陰性対照）発現量変化、APP770発現量変化、APP751発現量変化、およびAPP695発現量変化を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下にS-100 β がアミロイド前駆体タンパク質の遺伝子量を変化させず β アミロイド量を増加させることを確認した実験例を挙げて、本発明をより具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を制限するものではない。

実験例1：S-100 β による β アミロイド産生量測定

25 1) S-カルボキシメチル化S-100 β 調製

ヨード酢酸を用い、ラットリコンビナントS-100 β （東洋紡績（株））

をS-カルボキシメチル化した。

すなわち50mLチューブ内でリコンビナントS-100 β 溶液 34.5mL
(リコンビナントS-100 β 含量: 100mg)に炭酸水素ナトリウム 1.45
gを溶解した。次に、1-プロパノール 11.5mLを加えよく攪拌した(1-
5 プロパノール最終濃度25%)。さらにトリブチルホスフィン50 μ Lを加
え攪拌した後、室温で1時間静置した。その後、ヨード酢酸試薬(ヨード酢
酸を1mol/Lとなるように1mol/L水酸化ナトリウムに溶解、用時
調製)を1mL加え、遮光下、室温で1時間30分静置した。

反応液を透析膜(三光純薬)に移し、あらかじめ冷やしておいたトリスバ
10 ップファー(40mmol/L, Tris-HCl, pH7.5)で4℃下透析を
行なった。6時間以上経過した後、バッファー交換を行ない透析した。

透析回収サンプルをセントリプラスYM-10(アミコン)を用い濃縮し
た。濃縮後、0.22 μ mフィルター(ミリポア)を通してろ過滅菌した。これ
をS-カルボキシメチル化S-100 β (以下、CM-S-100 β と略記
15 することがある。)とし、-80℃で保存した。

2) ラットリコンビナントS-100 β の調製

ラットリコンビナントS-100 β (以下、rS-100 β と記すことが
ある。)は、東洋紡績(株)より入手したものを、透析を行ない濃縮およ
びろ過滅菌したものを使用した。操作は前記の「1) S-カルボキシメチル化
20 S-100 β 調製」に準じて行なった。

3) S-100 β による β アミロイド産生量測定

ヒトグリオブラストーマ、アストロサイトーマ由来細胞株であるU-37
3MG細胞(住商ファーマインターナショナル(株))を10%ウシ胎児血
清含有高グルコースダルベッコ改変イーグル培地(高グルコースダルベッコ
25 改変イーグル培地(DMEM)に10%ウシ胎児血清、20mmol/Lの
HEPES、2mmol/LのL-グルタミン、100U/mLペニシリン

および $100 \mu\text{mol/L}$ のストレプトマイシンを添加した培地。以下、 $10\% \text{FCS-DMEM}$ と記す。) にて、 $37^\circ\text{C} 5\% \text{CO}_2$ 下 75cm^3 のフラスコで継代培養した。

培養細胞をトリプシン/エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) により剥離
5 した。剥離した細胞は遠心後、 $2 \times 10^5 \text{cells/mL}$ となるよう $10\% \text{FCS-DMEM}$ 培地で希釈し、 24 穴プレートに 1mL/well で播種した。播種した細胞は $37^\circ\text{C} 5\% \text{CO}_2$ 下で培養した。

播種後二日目の細胞を無血清の $\text{DMEM } 1 \text{mL}$ で洗浄後、無血清の $\text{DMEM } 360 \mu\text{L}$ に培地を置換した。次にトリス緩衝溶液で既知の濃度に希釈し
10 た $\text{CM-S-100}\beta$ あるいは $\text{rS-100}\beta$ 溶液を $40 \mu\text{L}$ 添加し、 $37^\circ\text{C} 5\% \text{CO}_2$ 下で培養した。

$\text{S-100}\beta$ 処置 48 時間後に 24 穴プレートより培養上清を $300 \mu\text{L}$ 回収した。回収した培養上清は、 $15,000 \text{rpm}$ 、 4°C で 5 分間遠心して上清を回収し、測定用サンプルとした。サンプルは測定時まで氷上に保存した。

15 サンプル中の β アミロイド $1-40$ および β アミロイド $1-42$ の蓄積量をそれぞれヒューマン β アミロイド $1-40$ イライザキット (バイオスコア)、ヒューマン β アミロイド $1-42$ イライザキット (バイオスコア) を用いて測定した。測定法はキットの説明書に従った。その際サンプルはキット付属の希釈液を用い希釈した。それぞれのスタンダードの検量線より β アミロ
20 ド $1-40$ および β アミロイド $1-42$ 量を算出した。その結果を表 1 および図 1 ~ 2 に示す。

$\text{CM-S-100}\beta$ および $\text{rS-100}\beta$ は 10 および $30 \mu\text{mol/L}$ で U-373MG 細胞において β アミロイド $1-40$ の蓄積量をビヒクル処
置群と比較して有意に増加させた (図 1、表 1)。同様に、 $\text{CM-S-100}\beta$ は 10 および $30 \mu\text{mol/L}$ で、また $\text{rS-100}\beta$ は 3 、 10 およ
25 び $30 \mu\text{mol/L}$ で β アミロイド $1-42$ 蓄積量を有意に増加させた (図

2、表1)。

この結果から、S-100 β は β アミロイド産生促進作用を有していることが確認された。

表 1

処置	濃度 ($\mu\text{mol/L}$)	β -アミロイド1-40 (pg/ml.)	β -アミロイド1-42 (pg/mL)
ビヒクル	—	144 \pm 13.7	31.3 \pm 0.00
CM-S-100 β	3	172 \pm 6.4	39.6 \pm 8.33
	10	259 \pm 20.2 ^c	68.4 \pm 3.00 ^b
	30	341 \pm 14.4 ^c	55.2 \pm 1.73 ^a
rS-100 β	3	191 \pm 2.9	56.3 \pm 1.96 ^a
	10	272 \pm 25.1 ^c	59.3 \pm 4.48 ^a
	30	367 \pm 7.3 ^c	67.2 \pm 9.47 ^b

(a): $p < 0.05$ (対ビヒクル, ダネットテスト 例数3)

(b): $p < 0.01$ (対ビヒクル, ダネットテスト 例数3)

(c): $p < 0.001$ (対ビヒクル, ダネットテスト 例数3)

5 実験例2: アミロイド前駆体タンパク質mRNA発現量測定

1) mRNAサンプルの調製

前記と同様にS-100 β 処置したプレートを作成した。細胞上清を回収した後の細胞からクイックプレップmRNA精製キット(アマシャム・ファルマシア・バイオテック)を用いてmRNAを精製し、アミロイド前駆体タンパク質(以下、APPと略記することがある。)mRNA発現量測定用サンプルとした。mRNAサンプルは -80°C で保存した。

2) cDNAの調製

80 ngのmRNAからファーストストランド cDNA合成キット(アマシャム・ファルマシア・バイオテック)を用いてcDNAを合成し、さらに蒸留水で3倍希釈した後cDNAサンプルとした。

3) RT-PCR法

表2に示すPCR反応溶液を調製し、変性を98℃1秒、アニーリングを68もしくは70℃15秒の条件でPCRを行なった。反応液の一部を1%アガロースゲルで電気泳動を行なった。

表 2

反応成分	体積 (μL)	最終濃度
TaKaRa Z-Taq (2.5ユニット/μL)	0.5	0.25 ユニット/μL
10×Z-Taq 緩衝溶液	5	1×Z-Taq 緩衝溶液
dNTP混合液 (2.5mmol/L each)	4	200 μmol/L
cDNAサンプル	適量	
正プライマー (100 μmol/L)	0.5	1 μmol/L
負プライマー (100 μmol/L)	0.5	1 μmol/L
蒸留水	適量	
全量	50	

5

使用したプライマーの塩基配列を表 3 に示す。

表 3

標的遺伝子 (Access. No)		Primer name	Sequence	Size	配列 番号
β -actin (X00351)	Forward	hbAct-F	5' - CCATGTACGTTGCTATCCAGGC -3'	22mer	1
	Reverse	hbAct-R	5' - GTAGTTTCGTGGATGCCACAGG -3'	22mer	2
APP695 (Y00264)	Forward	APP695-F	5' - AAGAGGTGCTTCGAGTTCCTACA -3'	23mer	3
	Reverse	APP695-R	5' - GCGCGGACATACTTCTTTAGC -3'	21mer	4
APP751 (X06989)	Forward	APP751-F	5' - GTGTGTGGCAGCGCCATTCCTAC -3'	23mer	5
	Reverse	APP751-R	5' - TTGAACACGTGACGAGGCCGAG -3'	22mer	6
APP770 (X06981)	Forward	APP770-F	5' - CTCTTGCCCGAGATCCTGTAA -3'	22mer	7
	Reverse	APP770-R	5' - GCATATTGAACACGTGACGAGG -3'	22mer	8

4) 結果

アミロイド前駆体タンパク質 (APP 695、APP 751 および APP 770) の mRNA 発現量を検討した。その結果を対照 (β アクチンの発現量変化) と共に図 3 に示す。図 3 中、(1) は CM-S-100 β による β アクチン (陰性対照) 発現量変化、(2) は CM-S-100 β による APP 770 発現量変化、(3) は CM-S-100 β による APP 751 発現量変化、(4) は CM-S-100 β による APP 695 発現量変化、(5) は r S-100 β による β アクチン (陰性対照) 発現量変化、(6) は r S-100 β による APP 770 発現量変化、(7) は r S-100 β による APP 751 発現量変化、(8) は r S-100 β による APP 695 発現量変化を示す。

図 3 から明らかなように、CM-S-100 β および r S-100 β いずれの処置においても mRNA 発現量に変化はみられなかった。したがって、前記の S-100 β 処置群における β アミロイド産生量増加にその前駆体で

あるアミロイド前駆体タンパク質の発現量増加は関与していないことが示唆された。このことから、S-100 β は転写レベルではなく、 β セクレターゼおよび γ セクレターゼによるアミロイド前駆体タンパク質代謝の過程に作用している可能性が推定された。

5 実験例 3 : β アミロイド産生量測定による化合物評価

前記の実験例 1 と同様に U-373MG 細胞を調製し、24 穴プレートに 2×10^5 cells/mL となるよう 1 mL/well で播種した。播種した細胞は 37°C 5% CO₂ 下で培養した。

播種後二日目の細胞を無血清の DMEM 1 mL で洗浄後、無血清の DME
10 M320 μ L に培地を置換し、化合物の濃縮液（処置濃度の 10 倍濃度）を 40 μ L 添加した。次にトリス緩衝溶液で既知の濃度に希釈した r S-100 β 溶液を 40 μ L 添加し、37°C 5% CO₂ 下で培養した。

前記の実験例 1 と同様に、測定用サンプルを作成し、サンプル中の β アミロイド 1-40 の蓄積量を測定した。スタンダードの検量線より β アミロイド 1-40 量を算出した。その結果を表 4 に示す。
15

r S-100 β 処置における化合物存在下の β -アミロイド 1-40 産生作用を検討したところ、 γ -セクレターゼ阻害剤 I により抑制作用が認められた。また、抑制作用は AEBSF (β -セクレターゼ阻害作用)、PMA (α -セクレターゼ活性化作用)、ツニカマイシン（糖付加阻害剤）、ブレフェルジン
20 A (brefeldin A)、モネシン（ゴルジ、小胞体におけるタンパク質成熟化阻害作用）でも認められた。一方、中性エンドペプチダーゼ阻害剤のホスホラミドンでは増強作用が認められた。

表 4

化合物	β -アミロイド 1-40 産生量 (pg/mL)		
	ビヒクル	10 μ mol/L S-100 β	S-100 β + 化合物
20 μ mol/L γ セクレターゼ阻害剤	317.3	595.0	95.3
500 μ mol/L AEBSF	342.3	512.3	118.7
50 μ mol/L ホスホラミドン	142.3	304.0	583.3
10 μ mol/L PMA	400.3	554.3	374.3
3 μ mol/L ツニカマイシン	430.0	1098.3	417.7
5 μ g/mL プレフェルジン A	430.0	1098.3	22.3
5 μ mol/L モネシン	430.0	1098.3	229.7

請求の範囲

1. S-100 β 阻害剤を有効成分とする β アミロイド起因疾患の治療および／または予防剤。
- 5
2. S-100 β 阻害剤が以下の(1)～(6)の少なくともひとつから選択される機構に作用して β アミロイド産生を抑制する請求の範囲1記載の β アミロイド起因疾患治療および／または予防剤：
- (1) β セクレターゼおよび γ セクレターゼによる β アミロイド産生、
- 10 (2) α セクレターゼによるアミロイド前駆体タンパク質の代謝、
- (3) 中性エンドペプチダーゼによる β アミロイドの代謝、
- (4) S-100 β の細胞内への取り込み機構、
- (5) 糖付加、
- (6) タンパク質成熟化。
- 15
3. β アミロイドに起因する疾患が、神経変性疾患、ダウン症、ボクサー症、進行性核上麻痺、星状膠細胞腫、脳の神経機能障害、多発性硬化症、痴呆、精神分裂症、てんかん、不安、嘔吐、偏頭痛、神経細胞死、うつ病、睡眠障害、摂食障害、尿失禁、低酸素症、脳梗塞、脳腫瘍、高酸素痙攣および
- 20 高酸素毒症、炎症性もしくは神経障害性疼痛、髄膜炎である請求の範囲1に記載の β アミロイド起因疾患治療および／または予防剤。
4. ヒト由来グリア細胞に(1) S-100 β を添加し β アミロイド産生を亢進させた条件下において、被験化合物を添加して、細胞から放出された
- 25 β アミロイドを検出するか、または(2)被験化合物を添加し、S-100 β を添加して、細胞から放出された β アミロイドを検出することによって、

被験化合物の β アミロイド産生抑制作用を決定することを特徴とする β アミロイド産生抑制作用を有する化合物のスクリーニング方法。

5. β アミロイド産生抑制作用が以下の作用から選択される請求の範囲4
- 5 記載のスクリーニング方法；
 - (1) β セクレターゼまたは γ セクレターゼ阻害作用、
 - (2) α セクレターゼ活性化作用、
 - (3) 中性エンドペプチダーゼ活性化作用、
 - (4) S-100 β 取り込み阻害作用、
 - 10 (5) 糖付加阻害作用、
 - (6) タンパク質成熟化阻害作用。
6. 請求の範囲4記載のスクリーニング方法によって得られた化合物。
- 15 7. 請求の範囲6記載の化合物を有効成分とする請求の範囲1記載の β アミロイド起因疾患の治療および／または予防剤。

図 1

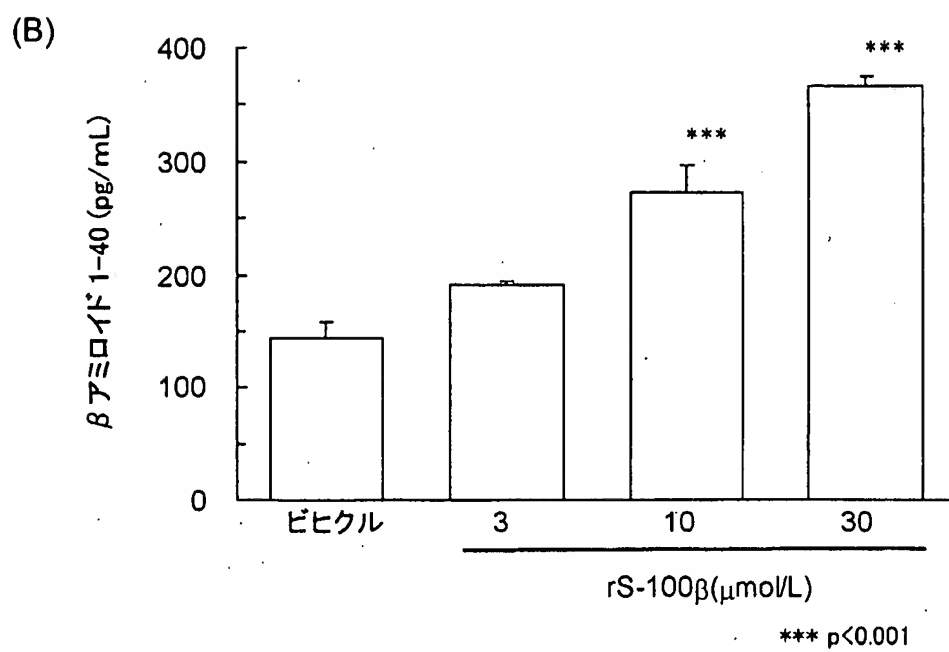
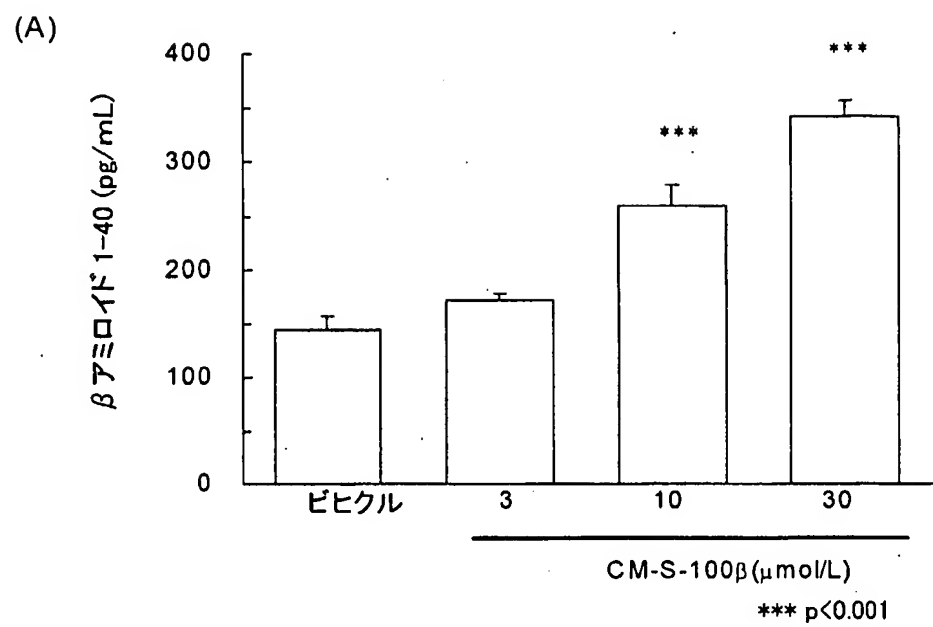


図 2

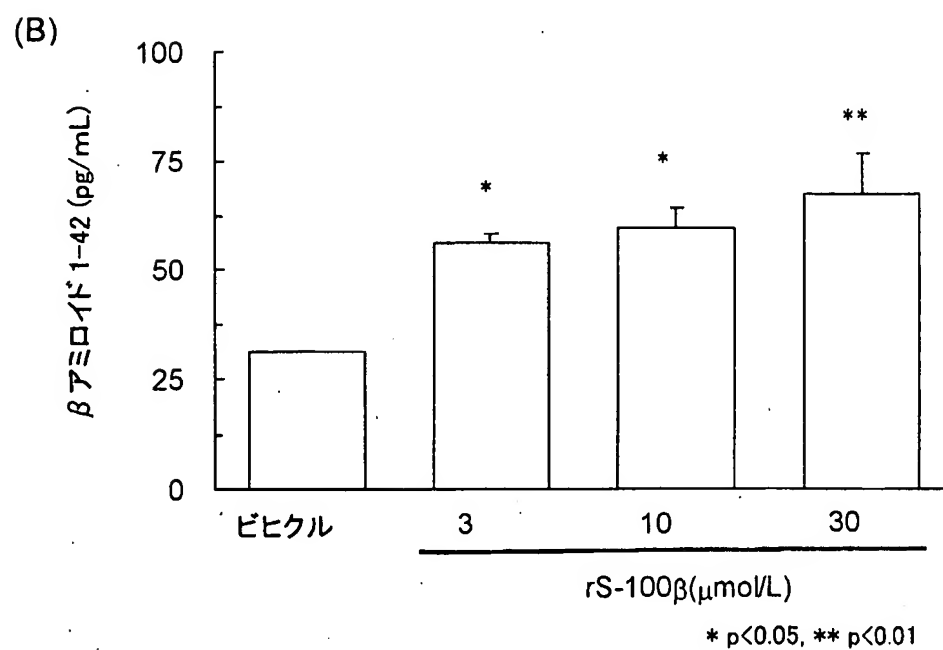
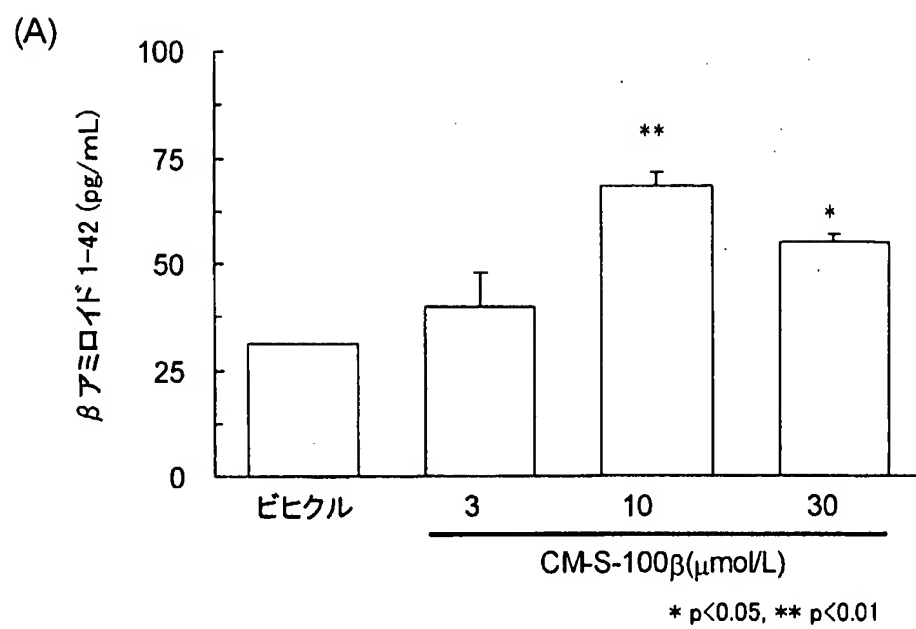
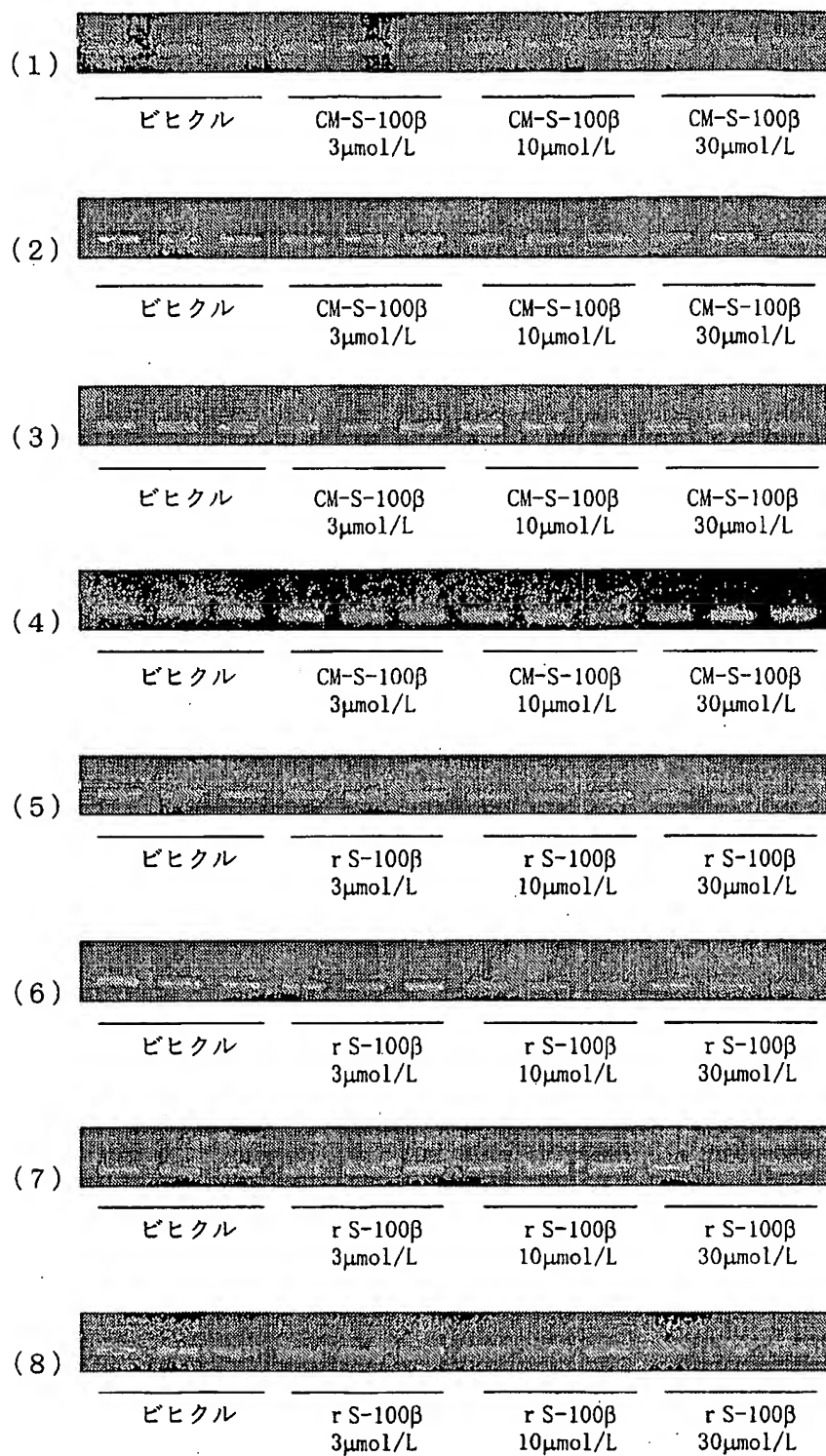


図 3



SEQUENCE LISTING

<110> ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> Treating agent for β -amyloid-caused disease comprising S-100 β inhibitor as an effective component.

<130> ONF-4297PCT

<150> JP 2001-279901

<151> 2001-09-14

<160> 8

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 1

ccatgtacgt tgctatccag gc

22

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 2

gtagtttcgt ggatgccaca gg

22

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 3

aagaggtggt tcgagttcct aca

23

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 4

gcgcggacat acttcttag c

21

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 5

gtgtgtggca gcgccattcc tac

23

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 6

ttgaacacgt gacgaggccg ag

22

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 7

ctcttgcccg agatcctgtt aa

22

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 8

gcataattgaa cacgtgacga gg

22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/09440

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K45/00, 31/7072, 31/336, 31/35, 31/661, 31/215,
A61P25/28, 25/16, 25/06, 25/08, 25/18, 25/20, 25/24, 35/00,
9/10, 3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K45/00, 31/7072, 31/336, 31/35, 31/661, 31/215,
A61P25/28, 25/16, 25/06, 25/08, 25/18, 25/20, 25/24, 35/00,
9/10, 3/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2002
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2002	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2002

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), REGISTRY (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GRIFFIN, Sue T. et al., Glial cells provide clues to neuronal degeneration, FASEB Journal, 2001 Mar., Vol.15, No.4, page A406, full text; particularly, lines 1 to 8	1-7
X	HU, Jingru et al., S100 β induced neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes, Journal of Neurochemistry, 1997, Vol.69, No.6, pages 2294 to 2301, full text; particularly, page 2294, abstract, lines 14 to 27	1-3
X	SINHA, Sukanto et al., Cellular mechanisms of beta-amyloid production and secretion, Proc.Natl.Acad. Sci.USA., 1999, Vol.96, No.20, pages 11049 to 11053, full text; particularly, page 11051, right column, lines 6 to 38	6,7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 29 November, 2002 (29.11.02)	Date of mailing of the international search report 17 December, 2002 (17.12.02)
---	--

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/09440

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CITRON, M. et al., Inhibition of amyloid β -protein production in neural cells by the serine protease inhibitor AEBSF, Neuron, 1996, Vol.17, No.1, pages 171 to 179, full text; particularly, page 171, Summary	6, 7
X	SAVAGE, Mary J. et al., Turnover of amyloid β -protein in mouse brain and acute reduction of its level by phorbol ester, The Journal of Neuroscience, 1998, Vol.18, No.5, pages 1743 to 1752, full text; particularly, page 1743, Summary	6, 7
X	LEBLANC, Andrea C. et al., Role of endoplasmic reticulum, endosomal-lysosomal compartments and microtubules in amyloid precursor protein metabolism of human neurons, Journal of Neurochemistry, 1999, Vol.72, No.5, pages 1832 to 1842, full text; particularly, page 1832, abstract; page 1834, right column, lines 1 to 41; page 1835, line 44 to page 1837, left column, line 3	6, 7

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/09440

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

It is recognized that the invention as set forth in claim 4 relates to "a method of screening a compound having an effect of inhibiting the production of β -amyloids". Since the compound obtained by the screening method is not restricted to those having an "S-100 β inhibitory" effect as described in claim 1, the gist and subject of the invention are not the same as those of the invention as set forth in claim 1.

Such being the case, the group of the inventions as set forth in claims 4 to 7 of the present application and the invention as set forth in claim 1 are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ A61K45/00, 31/7072, 31/336, 31/35, 31/661, 31/215, A61P25/28, 25/16, 25/06, 25/08, 25/18, 25/20, 25/24, 35/00, 9/10, 3/00		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ A61K45/00, 31/7072, 31/336, 31/35, 31/661, 31/215, A61P25/28, 25/16, 25/06, 25/08, 25/18, 25/20, 25/24, 35/00, 9/10, 3/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2002年 日本国登録実用新案公報 1994-2002年 日本国実用新案登録公報 1996-2002年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAPLUS (STN) BIOSIS (STN) REGISTRY (STN) EMBASE (STN) MEDLINE (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	GRIFFIN, Sue T. <i>et al</i> , Glial cells provide clues to neuronal degeneration, FASEB Journal, 2001 Mar, Vol.15, No.4, pA406, 全文, 特に第1-8行	1-7
X	HU, Jingru <i>et al</i> , S100 β induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes, Journal of Neurochemistry, 1997, Vol.69, No.6, pp2294-2301, 全文, 特に第2294頁Abstract第14-27行	1-3
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 29.11.02	国際調査報告の発送日 17.12.02	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 中木 亜希 電話番号 03-3581-1101 内線 3451	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	SINHA, Sukanto <i>et al</i> , Cellular mechanisms of beta-amyloid production and secretion, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1999, Vol.96, No.20, pp11049-11053, 全文, 特に第11051頁右欄第6-38行	6, 7
X	CITRON, M. <i>et al</i> , Inhibition of amyloid β -protein production in neural cells by the serine protease inhibitor AEBSF, Neuron, 1996, Vol.17, No.1, pp171-179, 全文, 特に第171頁Summary	6, 7
X	SAVAGE, Mary J. <i>et al</i> , Turnover of amyloid β -protein in mouse brain and acute reduction of its level by phorbol ester, The Journal of Neuroscience, 1998, Vol.18, No.5, pp1743-1752, 全文, 特に第1743頁Summary	6, 7
X	LEBLANC, Andrea C. <i>et al</i> , Role of endoplasmic reticulum, endosomal-lysosomal compartments and microtubules in amyloid precursor protein metabolism of human neurons, Journal of Neurochemistry, 1999, Vol.72, No.5, pp1832-1842, 全文, 特に第1832頁Abstract, 第1834頁右欄第1-41行, 第1835頁44行-第1837頁左欄第3行	6, 7

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

本願の請求の範囲4に係る発明は、「 $\sim\beta$ アミロイド産生抑制作用を有する化合物のスクリーニング方法」であると認められるが、当該スクリーニングによって得られる化合物は、請求の範囲1に記載の「S-100 β 阻害」作用を有するものに限られないため、請求の範囲1に係る発明とは発明の主要部及び課題が同一でない。

したがって、本願の請求の範囲4-7に係る発明は、いずれも請求の範囲1に係る発明と単一の一般的発明概念を形成するように関連している一群の発明とは認められない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続表 (1)) (1998年7月)